

Untersuchungen über die Kinetik der Spaltung von Di- und Tripeptiden

Von H. HARTMANN, J. HEINTGES * H. JUNG, J. HEIDBERG

Aus dem Institut für physikalische Chemie an der Universität Frankfurt am Main
(Z. Naturforschg. 17 b, 143—149 [1962]; eingegangen am 8. November 1961)

Wir ermittelten die Geschwindigkeitskonstanten sowie die Arrhenius'schen Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten der alkalischen Hydrolyse einer Reihe von Di- und Tripeptiden. Die zur Gewinnung der kinetischen Daten führende quantitative Analyse der Hydrolysate gelang, indem die Peptide vor ihrer Hydrolyse geeignet mit ^{14}C markiert, die Hydrolysate mit Hilfe der Papierchromatographie bzw. der Zonenelektrophorese getrennt und die isolierten Hydrolyseprodukte auf Grund ihrer Radioaktivität quantitativ bestimmt wurden.

Der zeitliche Verlauf der alkalischen Hydrolyse von Di- und Tripeptiden wird durch ein Zeitgesetz 1. Ordnung bezüglich des Peptids und bezüglich der Hydroxylionen dargestellt. Die Abstufungen der Aktivierungsenergien, die den einzelnen Peptidbindungen in Di- und Tripeptiden zugeordnet sind, lassen sich durch die Annahme deuten, daß die Hydrolyse nach dem B_{AC} 2-Mechanismus verläuft. Die Aktionskonstanten wachsen, wenn auch nicht regelmäßig, mit den Aktivierungsenergien.

Bei den bisher ausgeführten Untersuchungen über die Kinetik der Hydrolyse von Peptiden beschränkte man sich meist auf die Ermittlung der kinetischen Daten von Peptidbindungen in Dipeptiden. Wurden die Studien auf Tripeptide ausgedehnt, so mußte man sich wegen analytischer Schwierigkeiten mit der Erfassung ihrer summarischen Zerfalls-Geschwindigkeitskonstanten begnügen; es war nicht möglich, die Zerfalls-Geschwindigkeitskonstante eines Tripeptids in die beiden verschiedenen, den zwei Peptidbindungen zugehörigen Reaktions-Geschwindigkeitskonstanten zu zergliedern. Schließlich wurden nur in wenigen der vorliegenden Arbeiten Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten ermittelt¹.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die möglichst genaue Messung der kinetischen Größen einzelner Peptidbindungen in verschiedenen Di- und Tripeptiden. Die gewonnenen Meßergebnisse sollten im Rahmen der Vorstellungen über den Zusammenhang zwischen Reaktivität und Konstitution einer Verbindung ausgewertet und die Elementarprozesse der Peptidhydrolyse soweit wie möglich eruiert werden.

Wie aus den entsprechenden Zeitgesetzen und den zugehörigen stöchiometrischen Beziehungen hervorgeht, bringt diese Zielsetzung insofern gewisse analytische Probleme mit sich, als bei der Aufnahme der Kinetik der Hydrolyse eines Tripeptids die Konzentrationen mindestens dreier, nebeneinander in Lö-

sung vorliegender Peptidbausteine als Funktion der Zeit bestimmt werden müssen. Diese Aufgabe wurde gelöst, indem wir die Hydrolysate chromatographisch oder zonenelektrophoretisch trennten und zur quantitativen Erfassung der einzelnen Hydrolyseprodukte die Radioaktivität der vor ihrer Hydrolyse geeignet mit ^{14}C indizierten Hydrolyseprodukte heranzogen. Dieses Vorgehen begründeten und beschrieben wir bereits ausführlich an anderer Stelle².

Unsere Arbeit gliederte sich demnach in drei Abschnitte:

1. Die Synthese geeignet ^{14}C -markierter Peptide angemessener spezifischer Aktivität.
2. Die Hydrolyse der Peptide unter definierten Bedingungen sowie die Aufarbeitung und Analyse der Hydrolysate.
3. Die Ermittlung der kinetischen Daten und ihre Diskussion.

Synthesen ^{14}C -markierter Peptide

Bei der Synthese der radioaktiven Peptide gingen wir von den am Carboxylkohlenstoff markierten Aminosäuren Glycin und Alanin aus. Alanin erhielten wir aus K^{14}CN nach einem modifizierten Streckerschen Verfahren³, Glycin über das N-CI-Methylphthalimid ebenfalls aus K^{14}CN ⁴, das aus dem käuflichen $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$, Ammoniumchlorid und Kalium in einer Stickstoffatmosphäre sehr geringen Drucks hergestellt wurde⁵. Wie an anderer

* Teil der Dissertation, Frankfurt am Main 1959.

¹ K. HEYNS u. H. F. GRÜTZMACHER, Liebigs Ann. Chem. **642**, 174 [1961]. Dort weitere Literaturangaben.

² H. HARTMANN, J. HEIDBERG, J. HEINTGES u. H. JUNG, Z. analyt. Chem., **181**, 533 [1961].

³ F. WEYGAND u. H. SIMON, in: HOUBEN-WEYL, Methoden der organ. Chemie, Bd. IV, Teil 2, S. 533, Stuttgart 1955.

⁴ W. SAKAMI, W. E. EVANS u. S. GURIN, J. Amer. chem. Soc., **69**, 1110 [1947].

⁵ F. L. J. SIXMA, H. HENDRIKS, K. HELLE, U. HOLLSTEIN u. R. VAN LING, Recueil-Trav. chim. Pays-Bas **73**, 161 [1954].

Stelle schon ausführlich begründet, stellten wir die spezifische Aktivität des gewonnenen $K^{14}CN$ durch Verdünnen mit KCN in wäßriger Lösung auf etwa 1,5 mC/Mol ein².

Die Peptide wurden über die Carbobenzoxy-Aminosäuren⁶ (Cbo-) und Aminosäurebenzylester⁷ nach dem Wielandschen Anhydridverfahren⁸ synthetisiert. Die Chloracetylalanine stellten wir nach E. FISCHER aus Alanin und den Chloracetylchloriden⁹ dar.

Die Indizierung der Peptide mit ^{14}C ergab sich aus der chromatographischen bzw. elektrophoretischen Trennbarkeit der Hydrolysate².

0,01 Mol Cbo-Aminosäure in 20 ml abs. Tetrahydrofuran wurden mit 0,01 Mol Triäthylamin und nach Abkühlung auf $-10^{\circ}C$ mit 0,01 Mol Chlorkohlensäureäthylester versetzt. Nach 1-stdg. Stehen des Ansatzes in der Kältemischung gossen wir die Lösung von 0,011 Mol Aminosäurebenzylester-*p*-toluolsulfonat und 0,01 Mol Triäthylamin in etwa 20 ml Methylenchlorid in die Lösung des Anhydrids. Wir schüttelten kräftig, wobei sich CO_2 entwickelte und die Lösung sich langsam auf Zimmertemperatur erwärmte. Das Lösungsmittel wurde unmittelbar nach Aufhören der CO_2 -Entwicklung im Vak. abgezogen, der Rückstand mit Wasser und Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung 2-mal mit 1-n. Salzsäure und 2-mal mit 5-proz. $NaHCO_3$ -Lösung extrahiert sowie über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Essigesters im Vak. wurde der ölige Rückstand des Cbo-dipeptidbenzylesters aus Chloroform/Petroläther umkristallisiert. Die Ausbeuten betragen 60–70 Prozent.

Schmp.
[$^{\circ}C$]

Cbo-glycyl-DL-alanin-benzylester	86 ^{10a}
Cbo-DL-alanyl-glycin-benzylester	111 ^{10a}
Cbo-DL-valyl-glycin-benzylester	135
Cbo-DL-alanyl-DL-alanin-benzylester	112

Bei der Weiterverarbeitung zum Tripeptid spalteten wir den Cbo-Rest ab, indem wir 0,02 Mol Cbo-Dipeptidester mit 7 ml trockener 36-proz. HBr /Eisessiglösung digerierten. Nachdem sich alles gelöst hatte, fällten wir das gebildete Hydrobromid mit 150 ml abs. Äther und kristallisierten das Rohprodukt aus abs. Äthanol/abs. Äther um. Ausbeute 75 Prozent.

Glycyl-DL-alanin-benzylester-hydrobromid	Schmp. 177 $^{\circ}C$ ^{10c}
--	--

Die Cbo-Tripeptidbenzylester erhielten wir durch Verknüpfung einer weiteren Cbo-Aminosäure mit dem Dipeptidbenzylester, wie oben beschrieben. Ausbeute 50 Prozent.

Cbo-DL-alanyl-glycyl-DL-alanin-benzylester	Schmp. 127 $^{\circ}C$ ^{10d}
Cbo-DL-valyl-glycyl-DL-alanin-benzylester	112 $^{\circ}C$

Die Darstellung der Peptide gelang durch die gleichzeitige Abspaltung des Cbo-Restes und der Benzylgruppe unter den schonenden Bedingungen der Hydrogenolyse. Wir versetzten eine Lösung von 0,005 Mol Cbo-peptidbenzylester in 80 ml Methanol p. A. und $1/2$ ml Eisessig mit 0,3 g Pd-Katalysator und leiteten etwa 5 Stdn. lang einen kräftigen Wasserstoffstrom durch die Lösung in einer Hydrierbirne. Nach beendeter CO_2 -Entwicklung filtrierten wir, dampften das Filtrat i. Vak. zur Trockene ein und kristallisierten die Peptide aus wenig Wasser/abs. Äthanol um.

Substanz	Schmp. [$^{\circ}C$]	H [%]		C [%]		N [%]	
		ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Glycyl*-DL-alanin ^{10e}	222	6,89	6,85	41,00	40,65	19,15	19,41
DL-Alanyl-DL-alanin* ¹¹	265	6,96	7,38	44,25	44,22	19,35	18,80
DL-Alanyl-glycin* ^{10f}	225	6,89	6,71	41,00	40,99	19,15	18,76
DL-Valyl-glycin* ¹²	245	8,11	8,14	48,25	48,14	16,10	15,68
DL-Alanyl*-glycyl*-DL-alanin ^{10g}	202	6,96	7,38	44,25	44,22	19,35	18,80
DL-Alanyl-glycyl-DL-alanin*	202	6,96	7,07	44,25	44,04	19,35	18,97
DL-Valyl-glycyl*-DL-alanin*	210	7,81	7,62	49,05	49,03	17,15	16,76
Chloracetyl-DL-alanin* ¹³	125	4,87	4,95	36,25	36,06	8,46	8,26
Dichloracetyl-DL-alanin* ¹⁴	168	3,53	3,61	30,00	30,09	7,00	7,20

* Die mit einem * versehenen Aminosäuren sind an der Carboxylgruppe mit ^{14}C indiziert.

Tab. 1. Schmelzpunkte und C—H—N-Analysen der untersuchten Peptide.

⁶ M. BERGMANN u. L. ZERVAS, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

⁷ H. K. MILLER u. H. WAELSCH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 1092 [1952].

⁸ Th. WIELAND u. H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 [1951].

⁹ a) E. FISCHER, Ber. dtsh. chem. Ges. **37**, 2489 [1904].

b) W. S. FONES, J. org. Chemistry **17**, 1661 [1952].

^{10a} Schmp. 83–84 $^{\circ}$

^{10b} Schmp. 108–110 $^{\circ}$

^{10c} Schmp. 170–172 $^{\circ}$

H. ZAHN u. E. SCHNABEL,
Liebigs Ann. Chem. **605**,
212 [1957].

^{10d} Schmp. 149–150 $^{\circ}$

^{10e} Schmp. 230–232 $^{\circ}$ (Zers.)

^{10f} Schmp. 237 $^{\circ}$ (Zers.)

^{10g} Schmp. 227–230 $^{\circ}$ (Zers.)

¹¹ Schmp. 270 $^{\circ}$; E. FISCHER u. K. KAUTZSCH, Ber. dtsh. chem. Ges. **38**, 2375 [1905].

¹² Schmp. 247–248 $^{\circ}$; N. F. ALBERTSON u. F. C. MCKAY, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5323 [1953].

¹³ Schmp. 124–126 $^{\circ}$; E. FISCHER, s. l. c. ^{9a}.

¹⁴ Schmp. 169–171 $^{\circ}$; W. S. FONES, s. l. c. ^{9b}.

H. ZAHN u. E. SCHNABEL,
Liebigs Ann. Chem. **605**,
212 [1957].

Die Hydrolyse der Peptide und die Analyse der Hydrolysate

Wir hydrolysierten 0,01 molare Lösungen der Peptide in 0,100-n. Natronlauge (E. Merck) bei 4 verschiedenen Temperaturen. Bei der Wahl dieses Konzentrationsverhältnisses ließen wir uns von folgenden Überlegungen leiten.

1. Das Verhältnis der Konzentration der Natronlauge zu der des Peptids sollte so groß wie möglich sein, damit die relative Abnahme der Hydroxylionen-Konzentration im Verlauf der Reaktion möglichst gering blieb. 2. Konzentriertere Natronlauge als oben angegeben würde die Hydrolysegeschwindigkeit so stark erhöhen, daß die Verfolgung der Reaktion experimentell nur schwierig auszuführen wäre. Außerdem wird mit steigender Natronlauge-Konzentration die chromatographische Trennung des Hydrolysats schlechter. 3. Schwächere Natronlauge kann nicht angewendet werden, da in diesem Fall, wie unter 1 ausgeführt, die Konzentration des Peptids in gleichem Maße herabgesetzt werden müßte; infolge der Substanzverluste durch Adsorption u. dgl. wird jedoch in diesem Mengenbereich die quantitative Trennung relativ um so ungenauer, je weniger Substanz chromatographiert bzw. elektrophoretiert wird. Die geringe Hydrolysegeschwindigkeit des stabilen Valyl-glycins und die leichte Trennbarkeit seiner Hydrolyseprodukte erlauben ausnahmsweise die Anwendung 0,500-n. Natronlauge.

Im einzelnen verfahren wir wie folgt: Etwa 2,2 ml der alkalischen Peptidlösung wurden in einem Reagenzglas eingeschmolzen und 10–12 solcher Proben zur Ermittlung einer Geschwindigkeitskonstanten in einen geeignet temperierten Ultrathermostaten mit einer Temperaturkonstanz von $\pm 0,05^\circ$ gebracht. In angemessenen Zeitabständen wurden die Proben, möglichst während der 1. Halbwertszeit der Spaltung des betreffenden Peptids, entnommen und in zwei Parallelversuchen je 1 ml der Lösung mit einem geringen Überschuß 1-n. Salzsäure neutralisiert und anschließend einer Gefriertrocknung unterzogen, indem die Lösungen in flüssiger Luft eingefroren und die flüchtigen Substanzen im Vakuum (unter 1 Torr) über Silicagel und Ätznatron abgezogen wurden.

Die trockenen Substanzgemische wurden papierchromatographisch nach der absteigenden Methode mit einem Gemisch von Ameisensäure, sek. Butanol und Wasser auf dem ausgewaschenen Papier 2043 b

von Schleicher und Schüll getrennt. Die Trennung des Hydrolysats des Alanylalanins führten wir auf dem Pherographen nach Wieland und Pfeleiderer bei p_H 3,2 auf dem ausgewaschenen Papier MN 2 214 von Machery und Nagel aus. Die isolierten Substanzen eluierten wir aus dem Papier und zählten die eingedampften und getrockneten Eluate mit dem Methandurchflußzähler FH 51 mit dem 2π -Zählrohr FH 512 der Firma Friseke und Hoepfner Erlangen-Bruck aus.

Die gemessenen Aktivitäten waren den Mengen und diese den Konzentrationen der Hydrolyseprodukte direkt proportional.

Berechnung der kinetischen Größen

Indem wir die Logarithmen der Konzentrationen C bzw. der Zählraten (Impulse pro Min.) der Ausgangspeptide gegen die Zeit t graphisch auftrugen, machten wir die Annahme, daß die Peptidhydrolyse analog wie die übrigen Verseifungsreaktionen von Carbonsäurederivaten nach einem Zeitgesetz pseudo 1. Ordnung bezüglich des Ausgangspeptids verläuft.

$$\ln \frac{C_t}{C_{t=0}} = -k t. \quad (1)$$

Die Meßpunkte ordneten sich bei dieser Darstellung in befriedigender Weise längs einer Geraden an, womit unsere Annahme gerechtfertigt war. Wir legten deshalb auch der Ableitung des Zeitgesetzes für die Konsekutivreaktionen bei der Peptidspaltung Reaktionsschritte pseudo 1. Ordnung bezüglich des reagierenden Peptids zugrunde.

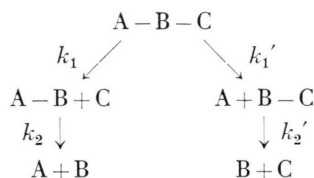
Aus den graphischen Darstellungen ließen sich die Halbwertszeiten τ der Di- und Tripeptide ablesen und die entsprechenden Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k nach

$$k = \frac{\ln 2}{\tau} \quad (2)$$

berechnen. Wir benutzten dieses graphische Verfahren zur Mittelwertbildung der k -Werte, da die rechnerischen Methoden bei ungleich größerem Aufwand in unserem Fehlerbereich von etwa 4% nur unwesentlich genauere Werte geliefert hätten.

Um die auf diese Weise erhaltenen Zerfalls-Geschwindigkeitskonstanten K der Tripeptide in die zwei, den beiden Peptidbindungen im Tripeptid zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_1'

aufzuspalten, zogen wir die dem Zerfallsschema eines Tripeptids A-B-C



entsprechenden Zeitgesetze heran:

$$[\text{A B C}]_t = [\text{A B C}]_{t=0} e^{-Kt} \quad (3 \text{ a})$$

mit

$$K = k_1 + k_1',$$

$$[\text{A B}]_t = k_1 \frac{[\text{A B C}]_{t=0}}{k_2 - K} (e^{-Kt} - e^{-k_2 t}), \quad (3 \text{ b})$$

$$[\text{B C}]_t = k_1' \frac{[\text{A B C}]_{t=0}}{k_2' - K} (e^{-Kt} - e^{-k_2' t}). \quad (3 \text{ c})$$

Aus der Stöchiometrie des obigen Reaktionssystems leiten sich die folgenden Beziehungen ab:

$$\begin{aligned}
 [\text{A B C}]_{t=0} &= [\text{A B C}]_t + [\text{A B}]_t + [\text{A}]_t \\
 &= [\text{A B C}]_t + [\text{A B}]_t + [\text{B C}]_t + [\text{B}]_t \\
 &= [\text{A B C}]_t + [\text{B C}]_t + [\text{C}]_t,
 \end{aligned} \quad (4)$$

welche die Berechnung der Konzentrationen der nicht direkt gemessenen Hydrolyseprodukte ermöglichen. Im Fall des Valyl-glycyl-alanins wurden die Konzentrationen des Glycins, Alanins und Glycylalanins sowie die Ausgangskonzentration des Tripeptids, die proportional der zeitlich konstanten Gesamtaktivität des Hydrolysats ist, direkt gemessen, während die Konzentrationen der chromatographisch nur schlecht trennbaren Peptidbausteine Valin, Valyl-glycin und Valyl-glycyl-alanin mit Hilfe der stöchiometrischen Beziehungen ermittelt wurden. Ähnlich verfahren wir beim Alanyl-glycyl-alanin.

Obwohl die vorliegenden Gleichungen die Kinetik der Tripeptidspaltung gemäß dem obigen Zerfallsschema vollständig beschreiben, hielten wir es für sinnvoller, für k_2 und k_2' die beim Zerfall der reinen Dipeptide gemessenen Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten in (3 b) und (3 c) einzusetzen und auf die doch nur zu Näherungswerten für k_2 und k_2' führende Auswertung der Gln. (3 b) und (3 c) zu verzichten, zumal angenommen werden kann, daß sich die Wechselwirkungen zwischen Di- und Tripeptiden einerseits und zwischen Dipeptiden andererseits in dem Konzentrationsbereich, in dem

wir arbeiteten, kaum — auch in quantitativer Hinsicht — unterscheiden.

Die Logarithmen der bei 4 verschiedenen Temperaturen ermittelten k -Werte trugen wir nach Arrhenius gegen die reziproke absolute Temperatur auf und bestimmten aus Steigung und Achsenabschnitt der erhaltenen Geraden die empirischen Aktivierungsenergien E_{exp} und die Aktionskonstanten A . Überdies berechneten wir diese Größen und ihre Fehlergrenzen unter Zugrundelegung der Arrheniuschen Beziehung durch Ausgleichsrechnung nach dem üblichen Verfahren.

Im Hinblick auf die spätere Diskussion brachten wir die experimentellen Resultate mit theoretisch hinreichend fundierten Größen in Beziehung. In der Theorie des Übergangszustandes ohne Berücksichtigung des Transmissionskoeffizienten ergibt sich die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante k zu¹⁵

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} K^\ddagger = \frac{k_B \cdot T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT}, \quad (5)$$

wobei k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, h das Plancksche Wirkungsquantum, R die Gaskonstante und ΔG^\ddagger die Änderung der freien Standardenthalpie beim Aktivierungsprozeß bedeuten. K^\ddagger entspricht einer Gleichgewichtskonstanten, die das postulierte Gleichgewicht zwischen dem aktivierten Komplex und den Reaktanten beschreibt. Durch Vergleich von Gl. (5) mit der empirischen Arrheniuschen Relation erhält man unter Außerachtlassung der Temperaturabhängigkeit der Dichte der Lösung folgende Zusammenhänge: *

$$\Delta H^\ddagger = E_{\text{exp}} - RT, \quad (6 \text{ a})$$

$$\Delta S^\ddagger = R \ln \frac{h \cdot A}{e k_B T}; \quad (6 \text{ b})$$

und für die Reaktion in Lösung

$$\Delta H^\ddagger \cong \Delta U^\ddagger. \quad (6 \text{ c})$$

ΔU^\ddagger , ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger bezeichnen die Änderungen der inneren Energie, der Enthalpie bzw. der Entropie beim Aktivierungsprozeß, bezogen auf den Standardzustand $c = 1 \frac{\text{Mol}}{\text{Liter}}$.

Die Geschwindigkeitskonstanten sind bezüglich der Hydroxylionenkonzentration nicht normiert.

¹⁵ S. GLASSTONE, K. J. LAIDLER, H. EYRING, The Theory of Rate Processes, New York and London 1941.

* Nach neueren Rechnungen lautet die Beziehung (6 a) $\Delta H^\ddagger = E_{\text{exp}} - 1/2 RT$.

Meßergebnisse

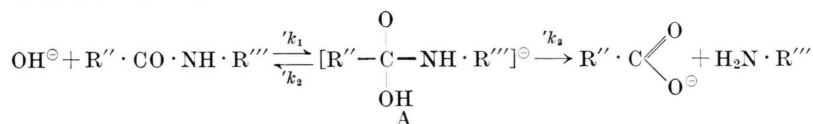
1. Halbwertszeiten τ und Geschwindigkeitskonstanten k .

	$T^\circ\text{K}$	$\tau(\text{d})$	$k \cdot 10^1 (d^{-1})$
<i>Glycyl-alanin</i>	315	10,9	0,634
	325	5,0	1,38
	333	3,0	2,31
	340	1,9	3,64
<i>Alanyl-alanin</i>	325	20,9	0,331
	333	11,5	0,602
	340	6,4	1,08
	348	3,85	1,80
<i>Alanyl-glycin</i>	315	11,2	0,617
	320	7,3	0,949
	325	4,8	1,44
	333	3,0	2,31
<i>Valyl-glycin</i> (in 0,1 - n · NaOH)	340	(120)	(0,0576)
	353	43	0,161
	363	21	0,329
	369	13	0,532
(in 0,5 - n · NaOH)	340	24,5	0,282
	353	8,50	0,815
	363	4,10	1,69
	<i>Chlorac.-alanin</i>	278	7,58
286		3,95	1,75
295		2,10	3,29
303		1,25	5,53
<i>Dichloracetyl-alanin</i>	270	0,981	7,07
	278	0,516	13,41
	285	0,341	20,20

	$T^\circ\text{K}$	$\tau(\text{d})$	$K(d^{-1})$	$k_1' \cdot 10^2 (d^{-1})$	$k_1(d^{-1})$
<i>Valyl-glycyl-alanin</i>	315	4,68	0,148	— —	— —
	325	2,81	0,246	0,427	0,242
	333	1,83	0,378	0,717	0,371
	340	1,28	0,539	1,27	0,526
	353	0,60	1,15	3,13	1,12
	363	0,45	1,54	— —	— —

	$T^\circ\text{K}$	$\tau(\text{d})$	$K \cdot 10 (d^{-1})$	$k_1 \cdot (d^{-1})$	$k_1' (d^{-1})$
<i>Alanyl-glycyl-alanin</i>	305	11,00	0,629	0,0476	0,0153
	315	5,50	1,38	0,108	0,0299
	325	2,45	2,83	0,222	0,0608
	333	1,60	4,32	0,300	0,132

Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten des Valyl-glycins bei zwei verschiedenen OH-Ionen-Konzentrationen beträgt:



¹⁶ M. L. BENDER, Chem. Reviews **60**, 53 [1960].

$T^\circ\text{K}$	0,1 - n · NaOH	:	0,5 - n · NaOH
340	1	:	4,90
353	1	:	5,06
363	1	:	5,12

Auswertung und Diskussion
der Meßergebnisse

Das Zeitgesetz für die alkalische Hydrolyse von Peptiden ergibt sich zu

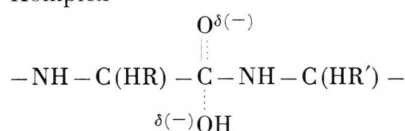
$$v = \frac{d[\text{Peptid}^\ominus]}{dt} = -k[\text{Peptid}^\ominus][\text{OH}^\ominus]; \quad (7)$$

denn die Resultate der bei verschiedenen Hydroxylionen-Konzentrationen ausgeführten Hydrolyseversuche am Valyl-glycin zeigten, daß die zum Zeitgesetz

$$v = -k'[\text{Peptid}^\ominus] \quad (8)$$

gehörende Geschwindigkeitskonstante k' der Hydroxylionen-Konzentration direkt proportional ist. Die Peptide lagen unter den Bedingungen der Hydrolyse praktisch vollständig als Anionen vor. In den Zeitgesetzen erscheinen deshalb die mit den analytischen Konzentrationen praktisch identischen Konzentrationen der Peptidanionen. Über die kinetische Ordnung bezüglich des Wassers läßt sich keine Aussage machen, da wir die Peptide in wäßriger Lösung hydrolysierten.

Die aus der Vielfalt des über Verseifungsreaktionen von Carbonsäurederivaten gesammelten Erfahrungsmaterials abgeleitete Struktur für den aktivierten Komplex ¹⁶



ist mit den von uns ermittelten Zeitgesetzen konsistent und demnach auch für Di- und Tripeptide wahrscheinlich. Es handelt sich bei diesem Körper um den Stoßkomplex des 1. Schrittes der Verseifungsreaktion, der Bildung des Anlagerungsproduktes A, wobei das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe aus dem trigonalen Valenzzustand im unversehrten Peptid in den tetragonalen Valenzzustand übergeht.

	E_{exp} [Kcal/Mol]	A [1/Mol · sec]	ΔH^\ddagger [Kcal/Mol]	ΔS^\ddagger [cal/Mol · grad]
Dichloracetylalanin	10,68 ± 0,18	3,7 · 10 ⁴	10,0*	-39,8*
Chloracetylalanin	12,05 ± 0,23	3,2 · 10 ⁴	11,4	-40,2
Glycyl-alanin	14,77 ± 0,34	1,4 · 10 ⁵	14,1	-37,3
Alanyl-glycin	16,13 ± 0,66	1,2 · 10 ⁶	15,5	-33,0
Alanyl-alanin	16,68 ± 0,40	6,5 · 10 ⁵	16,0	-34,2
Valyl-glycin (0,5 · n · NaOH)	19,05 ± 0,18	1,2 · 10 ⁶	18,4	-33,0
Valyl-glycin (0,1 · n · NaOH)	18,93 ± 0,32	9,9 · 10 ⁵	18,3	-33,4
Valyl-glycyl-alanin				
→ Valylglycin + Alanin	12,46 ± 0,17	6,7 · 10 ³	11,8	-43,3
→ Valin + Glycylalanin	16,39 ± 0,54	5,1 · 10 ⁴	15,7	-39,2
Alanyl-glycyl-alanin				
→ Alanylglycin + Alanin	13,6 ± 1,2	3,4 · 10 ⁴	13,0	-40,0
→ Alanin + Glycylalanin	15,3 ± 1,2	1,6 · 10 ⁵	14,6	-37,0

Tab. 2. Aktivierungsenergien, Aktionskonstante, Aktivierungsentropien. * Die Werte für ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger beziehen sich auf eine Temperatur $T = 340^\circ\text{K}$.

Da die Konzentration des Additionsproduktes A bei der Peptidhydrolyse unterhalb der Nachweisgrenze der klassischen analytischen Methoden liegt und deshalb äußerst gering sein muß, folgt, daß $k_1 \ll (k_2 + k_3)$. Die Versuche von M. L. BENDER über die relativen Austauschgeschwindigkeiten von Sauerstoff in Amiden, deren Carbonylsauerstoff mit ¹⁸O markiert war, zeigten, daß $k_3 \approx k_2$. Der Übergangszustand der Gesamtreaktion ist demnach mit dem des 1. Schrittes identisch.

Diese Auffassungen über die Elementarprozesse bei der Verseifung von Di- und Tripeptiden werden durch die Analyse der Aktivierungsentropien und Aktivierungsenergien gestützt.

Hervorzuheben sind zunächst die außerordentlich geringen Werte der Aktivierungsentropien. Diese werden als ein Ausdruck für die wesentliche Beteiligung des Wassers an der Reaktion angesehen. Da es sich bei der alkalischen Peptidhydrolyse um eine Reaktion zwischen gleichsinnig geladenen Ionen handelt, war mit einer negativen Aktivierungsentropie zu rechnen. Gleichwohl überrascht der hohe negative Betrag. Denn der elektrostatische Beitrag ΔS_e^\ddagger zur Aktivierungsentropie, der sich für die Spaltung derjenigen Peptidbindung berechnen lassen sollte, welche der freien Aminogruppe im Tripeptid benachbart ist, ergibt sich unter Vernachlässigung des Salzeffektes nach der Beziehung¹⁵

$$\Delta S_e^\ddagger = N_L \cdot \frac{z_1 \cdot z_2 \cdot e_0^2}{r^\ddagger \cdot \epsilon} \cdot \frac{\partial \ln \epsilon}{\partial T} \quad (9)$$

zu etwa -3 bis -4 cal/(Mol. grad), wenn man für den Abstand r^\ddagger der Ladungen im Übergangs-

komplex 6 Å, für die Dielektrizitätskonstante ϵ den makroskopischen Wert 80 und für $\partial \ln \epsilon / \partial T = -0,0046$ einsetzt; (N_L bezeichnet die Loschmidtsche Zahl, z die Anzahl der Elementarladungen und e_0 die Elementarladung). Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß sich die experimentell ermittelten relativen Abstufungen der Dissoziationskonstanten von Carbonsäuren infolge der unterschiedlichen Entfernung r elektrisch geladener Substituenten von der dissoziationsfähigen Gruppe in befriedigender Weise quantitativ durch Einführung der makroskopischen DK beschreiben ließen, wenn nur die Abstände r groß genug waren¹⁷.

Es ist nicht anzunehmen, daß die stark negativen Beträge der Aktivierungsentropien ausschließlich durch den Entropieverlust der gegenüber den Ausgangsstoffen zusätzlich an den stark polaren aktivierten Komplex gebundenen Wassermoleküle verursacht werden. Das im Ausgangszustand aus den beiden Reaktanten bestehende System büßt beim Übergang in den Aktivierungszustand 3 Translations- und 2 Rotationsfreiheitsgrade ein; die damit verknüpfte Entropieabnahme dürfte auch bei Berücksichtigung der Behinderung der äußeren Bewegungsformen der gelösten Reaktanten nur zum Teil durch den Entropiegewinn ausgeglichen werden, der durch den Zuwachs an 4 inneren Freiheitsgraden bedingt wird.

¹⁷ E. J. COHN, J. T. EDSALL, Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions, New York 1943.

Die Abstufungen der Aktivierungsentropien zeigen, wie schon mehrfach beobachtet, einen, wenn auch nicht völlig regelmäßig, gleichsinnigen Gang wie die Aktivierungsenergien. Aus der Richtung des Zusammenhangs ist zu schließen, daß dieser nicht durch eine zunehmende sterische Behinderung der Wechselwirkung zwischen den Reaktionspartnern verursacht wird, da mit der Erhöhung der Aktivierungsenergien infolge Eindellung abgeschlossener Elektronenhüllen eher eine Erniedrigung als eine Zunahme der Aktivierungsentropie als Folge der herabgesetzten Beweglichkeit des Systems zu erwarten ist. Zumindest mitbestimmend für die Änderung der Aktivierungsentropien beim Übergang von einem Peptid zum andern dürfte die unterschiedliche Solvatation sein. Die aus den schwankenden stark negativen Aktivierungsentropien zu folgernde Beteiligung des Wassers an der Reaktion bringt eine gewisse Unbestimmtheit in die Diskussion über die Größe und Abstufung der Aktivierungsenergien. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen jedoch, daß die Abstufungen der Aktivierungsenergien allein durch den Einfluß der Substituenten ohne besondere Berücksichtigung der Solvatation gedeutet werden können. Da sich außerdem die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten durch die Arrheniusche Gleichung mit einer in Näherung temperaturunabhängigen Aktivierungsenergie darstellen läßt, sollte der Anteil der stärker temperaturabhängigen Solvatationswärme an der Aktivierungsenergie nicht ins Gewicht fallen, wenn auch nicht übersehen werden soll, daß der Temperaturbereich, in dem die Messungen vorgenommen werden konnten, relativ klein war.

Im Einklang mit der oben formulierten Struktur des Übergangskomplexes sinkt bei Variation der Substituenten die Aktivierungsenergie, wenn die Ladungsdichte am Carbonylkohlenstoffatom durch positivierende Atomgruppen erniedrigt und dadurch die Abstoßung des angreifenden Hydroxylions vermindert wird. Ordnen wir eine Gruppe von Peptiden, deren gemeinsames Merkmal z. B. die carb-

oxylendständige Aminosäure Alanin ist, nach steigenden Aktivierungsenergien der Peptidbindungen, an denen das Alanin beteiligt ist, so gruppieren sich die Peptide in einer Reihe, wie man sie auf Grund des abnehmend positivierend wirkenden induktiven Effekts erwartet, den die einzelnen Gruppen auf den Carbonylkohlenstoff ausüben.

	$\Delta U^\ddagger \approx \Delta H^\ddagger$ [Kcal/Mol]	ΔS^\ddagger [cal/Mol · grad]
Dichloroacetyl-alanin	10,0	— 39,8
Chloroacetyl-alanin	11,4	— 40,2
Valylglycyl-alanin	11,8	— 43,3
Alanylglycyl-alanin	13,0 (\pm 1,2)	— 40,0
Glycyl-alanin	14,1	— 37,3
Alanyl-alanin	16,0	— 34,2

Die analoge Beobachtung macht man, wenn die aminoendständige Aminosäure konstant gehalten und der carboxylendständige Peptidrest variiert wird:

	$\Delta U^\ddagger \approx \Delta H^\ddagger$ [Kcal/Mol]	ΔS^\ddagger [cal/Mol · grad]
Alanyl-glycylalanin	14,6	— 37,0
Alanyl-glycin	15,5	— 33,0
Alanyl-alanin	16,0	— 34,2

Diese Beispiele mögen zur Demonstration des induktiven Substituenteneffektes auf die Reaktivität der Peptide genügen.

In der Reihe

	$\Delta U \approx \Delta H^\ddagger$ [Kcal/Mol]	ΔS^\ddagger [cal/Mol · grad]
Glycyl-alanin	14,1	— 37,3
Alanyl-glycin	15,5	— 33,0
Alanyl-alanin	16,0	— 34,2
Valyl-glycin	18,3	— 33,4

dürfte an der Erhöhung der Aktivierungsenthalpie die sterische Abstoßungsenergie wegen des wachsenden Raumbedarfs der Atomgruppen in der Umgebung des Reaktionszentrums wesentlich beteiligt sein.